

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C12N 15/00, C07H 21/04		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 85/ 00621 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Februar 1985 (14.02.85)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP84/00196 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Juni 1984 (28.06.84) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 33 26 520.8 (32) Prioritätsdatum: 22. Juli 1983 (22.07.83) (33) Prioritätsland: DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: KÖSTER, Hubert [DE/DE]; Hallerstrasse/4, D-2000 Hamburg 13 (DE). (74) Anwalt: GLAWE, DELFS, MOLL, MENGDEHL, NIEBUHR; Rothenbaumchaussee 58, Postfach 25 70, D-2000 Hamburg 13 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR THE DEFINITE CROSS-LINKING OF DOUBLE HELIX DNA FRAGMENTS BY MEANS OF A LINKAGE DNA AS WELL AS OLIGONUCLEOTIDES USED AS LINKAGE DNA (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DEFINIERTEN VERKNÜPFUNG DOPPELHELIKALER DNA-FRAGMENTE MITTELS EINER LINKER-DNA SOWIE ALS LINKER-DNA GEEINGNETE OLIGONUCLEOTIDE (57) Abstract <p>Process for the definite cross-linking of DNA fragments by means of cohesive ends by replacing a first fragment by a linkage DNA, dividing the obtained DNA in the region of the linkage sequence during the formation of the cohesive end and cross-linking the obtained DNA having the cohesive end with a second DNA fragment, the cohesive ends of the first end of the second DNA fragment being complementary. As linkage DNA, an oligonucleotide is used which has the formula $R^1 - (X)_n - R^2$ wherein R^1 and R^2 represent, reading from left to right, identical tetranucleotide sequences, in themselves complementary, having the formula (II), or R^1 is a pentanucleotide sequence having the formula (III) and R^2 is a pentadesoxynucleotide sequence having the formula (IV), the central nucleotides being complementary sequences of R^1 and R^2 groups being identical, or else R^1 representing a tetranucleotide or pentanucleotide sequence which is not complementary in itself or an hexanucleotide sequence having the formula (V), (VI) or (VII) and R^2 a complementary nucleotide sequence enantiomorphous of R^1 and of the same length. X is a short intermediary compound having the form of an oligonucleotide comprising from 2 to 30 nucleotide units.</p>			
(57) Zusammenfassung Verfahren zur definierten Verknüpfung von DNA-Fragmenten über kohäsive Enden durch Umsetzung eines ersten Fragmentes mit einer Linker-DNA, Spaltung der erhaltenen DNA im Bereich der Linker-Sequenz unter Ausbildung eines kohäsiven Endes und Verknüpfung der erhaltenen, das kohäsive Ende aufweisenden DNA mit einem zweiten DNA-Fragment, wobei die kohäsiven Enden des ersten und des zweiten DNA-Fragmentes komplementär sind. Als Linker-DNA wird ein Oligonucleotid der Formel (I) $R^1 - (X)_n - R^2$ in der R^1 und R^2 von links nach rechts gelesen identische, in sich selbst komplementäre Tetranucleotidsequenzen der Formel (II), oder R^1 eine Pentanucleotidsequenz der Formel (III) und R^2 eine Pentadesoxynucleotidsequenz der Formel (IV) darstellen, wobei die mittleren Nucleotide komplementär sind und die Sequenzen der Gruppen R^1 und R^2 im übrigen identisch sind oder R^1 eine nicht in sich selbst komplementäre Tetra- oder Pentanucleotidsequenz oder eine Hexanucleotidsequenz der Formeln (V), (VI) oder (VII) und R^2 eine zu R^1 spiegelbildlich komplementäre Nucleotidsequenz gleicher Länge ist. X ist ein kurzer Spacer in Form eines aus 2 bis 30 Nucleotideinheiten bestehenden Oligonucleotids.			

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	KR	Republik Korea
AU	Australien	LI	Liechtenstein
BE	Belgien	LK	Sri Lanka
BG	Bulgarien	LU	Luxemburg
BR	Brasilien	MC	Monaco
CF	Zentrale Afrikanische Republik	MG	Madagaskar
CG	Kongo	MR	Mauritanien
CH	Schweiz	MW	Malawi
CM	Kamerun	NL	Niederlande
DE	Deutschland, Bundesrepublik	NO	Norwegen
DK	Dänemark	RO	Rumänien
FI	Finnland	SD	Sudan
FR	Frankreich	SE	Schweden
GA	Gabun	SN	Senegal
GB	Vereinigtes Königreich	SU	Soviet Union
HU	Ungarn	TD	Tschad
JP	Japan	TG	Togo
KP	Demokratische Volksrepublik Korea	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Verfahren zur definierten Verknüpfung doppelhelikaler DNA-Fragmente mittels einer Linker-DNA sowie als Linker-DNA geeignete Oligonucleotide. - | -

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur definierten Verknüpfung doppelhelikaler DNA-Fragmente über kohäsive Enden mit den im Anspruch 1 angegebenen Merkmalen. Die Erfindung betrifft weiterhin eine doppelhelikale Linker-DNA der im Anspruch 1 angegebenen Formel I, in der R^1 , R^2 , X und n wie oben definiert sind. Das Verfahren bzw. die Linker-DNA der Erfindung kann für eine gezielte Veränderung des Erbmaterials verwendet werden.

Restriktions-Linker sind bekannt (Scheller et al., Science Bd. 196, 177 (1977))

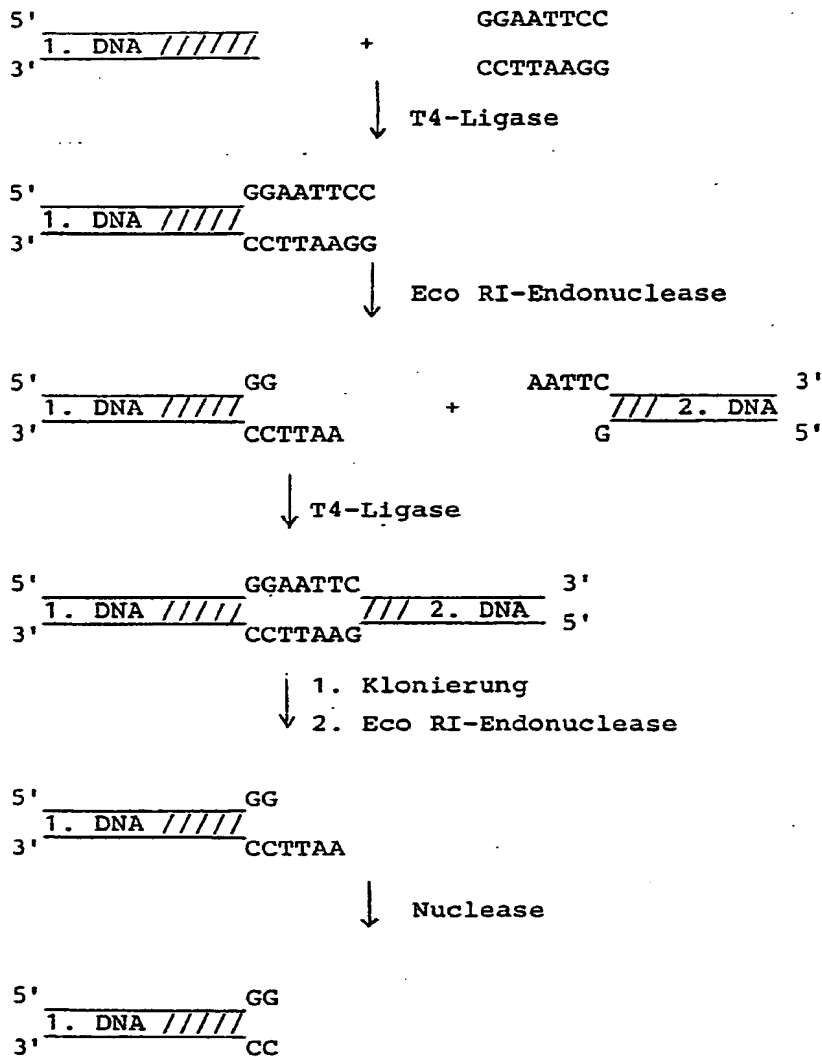
und werden seit langem in der Molekularbiologie und Gentechnologie verwendet. Ihnen ist gemeinsam, daß die Erkennungsregion für die Restriktionsendonuclease im zentralen Teil der Oligonucleotidsequenz liegt und in der Regel im 5' - und 3'-endständigen Bereich von G-/C-reichen Sequenzen flankiert wird. Im folgenden werden zwei Beispiele für bekannte Linker-Sequenzen gegeben:

Eco RI-Linker: d(GGAATTCC)
Bam HI-Linker: d(CGGATCCG)

Die Nachteile dieser Linker sollen im folgenden an einem Beispiel erläutert werden. Nach Ligation dieser Linker an DNA mit Hilfe von T4-Polynucleotidligase wird durch diese Linker das Erbmaterial (DNA) unweigerlich und irreversibel verändert, da nach dem "Schneiden" mit der entsprechenden Restriktionsendonuclease (gegebenenfalls nach erfolgter Klonierung etc.) auch nach Anwenden einer einzelstrangspezifischen Endo-/Exonuclease, ein Teil der angekoppelten Linkernucleotide an der DNA verbleiben:



~ 2 ~



Es wird deutlich, daß bei diesem Beispiel gemäß dem Stand der Technik die ursprüngliche DNA um 2 GC-Basenpaare verlängert wurde.

- 3 -

Die Nachteile des bekannten Verfahrens können mit dem Verfahren bzw. der Linker-DNA der Erfindung vermieden werden, da sie ermöglichen, die ursprüngliche Erbinformation in unveränderter Weise zurückzugewinnen. Die Merkmale des Verfahrens der Erfindung ergeben sich aus dem kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1.

Der hier verwendete Begriff "komplementär" bedeutet komplementär im Sinne von Watson und Crick. "Spiegelbildlich komplementär" bedeutet, daß zwei Sequenzen komplementär sind, wenn die eine von links nach rechts und die andere von rechts nach links gelesen wird.

Die Oligonucleotide I weisen normalerweise ebenso wie die ersten und zweiten DNA-Fragmente am 5'-Ende eine Phosphatgruppe auf; fehlt diese am Oligonucleotid I, ist lediglich dafür zu sorgen, daß das 1. bzw. 2. DNA-Fragment an der Verknüpfungsstelle für die Linker-DNA eine 5'-ständige Phosphatgruppe aufweist. Fehlt die Phosphatgruppe im ersten oder zweiten DNA-Fragment, muß das Oligonucleotid I eine 5'-Phosphatgruppe aufweisen.

Wenn R^1 eine der durch Kombination der vier Nucleotide A, T, C und G möglichen, nicht in sich selbst komplementären Tetranucleotidsequenzen ist, ergeben sich die aus Tabelle 1 ersichtlichen Sequenzen. Wenn R^1 eine der durch Kombination der vier Nucleotide A, T, C und G möglichen, nicht in sich selbst komplementären Pentanucleotide ist (in Anbetracht der ungeraden Nucleotidzahl sind Pentanucleotidsequenzen ausschließlich nicht in sich selbst komplementär), erhält man durch analoge Permutation die hier im einzelnen nicht wiedergegebenen möglichen Sequenzen, z.B.



- 4 -

```

(5')AAAAA (3')
AAAAAT
.
.
.
.
.
GGGGC
GGGGG

```

Sinngemäß können auch durch entsprechende Permutation die Kombinationsmöglichkeiten für in sich selbst oder nicht in sich selbst komplementäre Hexanucleotide aus den Nucleotiden A, T, C und G erhalten werden, z.B.

```

(5')AAAAAA (3')
(5')AAAAAT (3')
AAAATT
AATTTT
.
.
.
.
.
GGCCCC
GGGGCC
GGGGGC
GGGGGG

```

Für die hier angesprochenen Fälle, daß R^1 eine nicht in sich selbst komplementäre Tetra- oder Penta- oder eine in sich oder nicht in sich selbst komplementäre Hexanucleotidsequenz ist, gilt, daß R^2 die zu R^1 spiegelbildlich komplementäre Sequenz mit gleicher Kettenlänge aufweisen muß, z.B.

```

(5')ACTA(X)nTAGT(3').
(5')CACACA(X)nTGTGTG(3')
(5')AAATT(X)nAAATT(3')

```



- 5 -

Weiterhin gilt für diese Fälle, daß entweder R^1 oder R^2 ein einziges Ribonucleotid enthalten muß, und zwar in den endständigen Positionen 3' oder 5', oder gegebenenfalls auch X ein 3'- oder 5'-endständiges Ribonucleotid enthält, z.B.

(5')C*ACAGC*TGTC(3'),

wobei $R^1 = C*ACA$, $R^2 = TGTC$ und $X = GC*$ bedeuten und die Ribonucleotide durch * markiert sind.

Es gilt die Regel, daß zur Erzeugung kohäsiver Enden in dem Spacer X ein Ribonucleotid vorhanden sein muß, wenn entweder R^1 oder R^2 ein Ribonucleotid aufweisen; ein Ribonucleotid im Spacer X ist dagegen nicht erforderlich, wenn R^1 und R^2 je ein Ribonucleotid enthalten.

Es ist jedoch auch möglich, daß R^1 und R^2 5'- oder 3'-ständige Ribonucleotide enthalten, wobei die jeweilige Positionierung des Ribonucleotids bestimmt, welche Kettenlänge das übertragene kohäsive Ende aufweist.

Weiterhin gilt, daß T* (Ribothymidin) durch das gleichwirkende U* (Ribouridin) ersetzt sein kann.

Eine Aufzählung und Beschreibung von Restriktionsendonucleasen der Klassen II und III ist in der Firmenschrift "Restriction Endonucleases" der Boehringer Mannheim GmbH, 1981, enthalten; diese Veröffentlichung enthält auch Restriktionsendonucleasen der Klassen II und III, die für das Verfahren der Erfindung verwendbar sind, in der folgenden Beschreibung jedoch nicht namentlich genannt werden.

Mit dem Verfahren der Erfindung lassen sich 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, vorzugsweise 4, Nucleotide aufweisende kohäsive Enden auf die erste DNA übertragen, wobei Nucleotide aus der



- 6 -

Spacer-Gruppe X nicht mit Übertragen werden. Es ist jedoch auch möglich, wie später an einem Beispiel gezeigt wird, aus dem Spacer X ein oder mehrere Nucleotide mit auf die erste DNA zu übertragen, und zwar bei geeigneter Positionierung eines Ribonucleotids in der Gruppe X.

Die Ausbildung der kohäsiven Enden an der 1. DNA erfolgt durch Spaltung des aus der 1. DNA und der Linker-DNA erhaltenen Reaktionsproduktes, das in allgemeiner Schreibweise wie im Schema I dargestellt werden kann (am Schluß der Beschreibung).

Im Schema 1 bedeutet N die die Reste R^1 bildenden Nucleotide A, T, G und/oder C bzw. A*, T*, G*, C* und/oder U*, und X die oben definierte Oligonucleotidgruppierung mit 2-30 Nucleotideinheiten. Weiterhin sind mit Pfeilen die Spaltungspositionen gemäß vier Spaltungsvarianten a, b, c und d dargestellt, auf die im folgenden eingegangen wird.

Varianten a, b:

Die Spaltung erfolgt mittels Restriktionsendonucleasen der Klassen II bzw. III und führt zu der Ausbildung eines kohäsiven Endes an der Fremd-DNA, das die gleiche Nucleotidzahl aufweist wie die Gruppe R^1 bzw. R^2 der Linker-DNA. Je nach Spezifität der Endonuclease wird das kohäsive Ende am 5'- oder 3'-Ende der Fremd-DNA erzeugt.

Varianten c, d:

Die Spaltung erfolgt mittels Basen bzw. RNA-sen, setzt somit voraus, daß an den Spaltungspositionen Ribonucleotide A*, T*, C*, G* oder U* vorhanden sind, wobei zu beachten ist, daß die Spaltung immer am 3'-Ende des Ribonucleotids

- 7 -

erfolgt. Je nach Positionierung der Ribonucleotide wird das kohäsive Ende am 5'- oder 3'-Ende der Fremd-DNA erzeugt; weiterhin bestimmt die Positionierung der Ribonucleotide die Kettenlänge (1-6) des übertragenen kohäsiven Endes. Das kohäsive Ende kann ausschließlich aus den Nucleotiden der Gruppen R^1 und R^2 stammen; es können jedoch zusätzlich noch Nucleotide aus der Spacerregion übertragen werden.

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung kann man das ein kohäsives Ende aufweisende, erste DNA-Fragment vor der Verknüpfung mit dem zweiten DNA-Fragment mit einer an sich bekannten, kohäsive Enden unterschiedlicher Restriktionsspezifizität aufweisenden Adapter-DNA umsetzen. Auch für diese Variante wird später noch ein Beispiel gegeben.

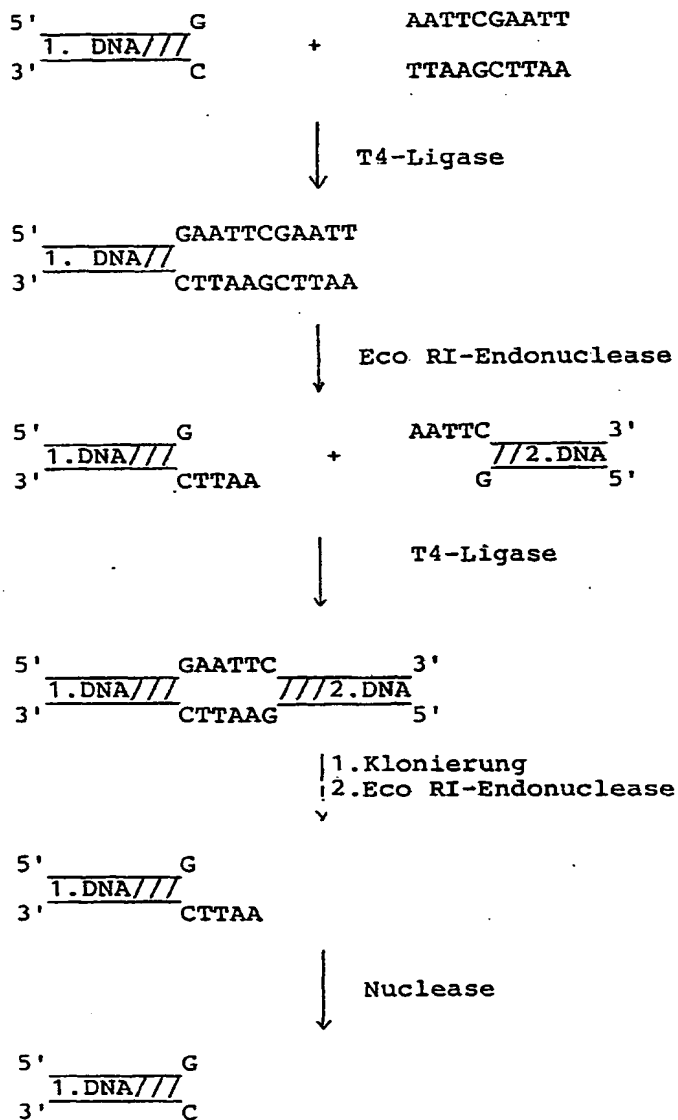
Das Verfahren der Erfindung wird im folgenden anhand von bevorzugten Beispielen näher erläutert.

Wenn in den Oligonucleotiden der allgemeinen Formel I R^1 und R^2 Sequenzen der allgemeinen Formel II bedeuten, d.h. z.B. die zentrale Erkennungsregion von Restriktionsendonucleasen der Klassen II und III, und $(X)_n$ eine kurze Spacerregion darstellt, lassen sich mit diesen Oligonucleotiden mit Hilfe von Ligasen, insbesondere T_4 -Polynucleotidligase Erkennungsregionen für Restriktionsendonucleasen in genetisches Material (DNA) einbauen. Dabei gestatten es die Oligonucleotide der Formel I, daß nach erfolgter Kopplung und Klonierung die ursprüngliche Erbinformation in unveränderter Form zurückgewonnen wird. Dies wird dadurch erreicht, daß sich die den kohäsiven Teil beinhaltende Signalsequenz der Restriktionsendonuclease an den beiden Enden des Oligonucleotids befindet.



- 8 -

Das folgende Beispiel 1 verdeutlicht die Vorteile, die mit einem Oligonucleotid der Erfindung der Formel d- (AATTCGAATT) erreichbar sind.



- 9 -

Es wird deutlich, daß mit dem Verfahren bzw. dem Oligonucleotid der Erfindung die Erbinformation (1. DNA) nach Kopplung derselben mit dem Oligonucleotid der Erfindung bzw. der Linker-DNA, Spaltung unter Erzeugung eines kohäsiven Endes, Kopplung an eine zweite DNA (Vektor-DNA) mit einem komplementären kohäsiven Ende, Klonieren, erneute Spaltung und Abspaltung des kohäsiven Endes in unveränderter Form zurück-erhalten wird.

Die Einführung Endonuclease-spezifischer kohäsiver Enden gemäß der Erfindung hängt vom endständigen Basenpaar der ersten DNA ab. Einige Beispiele für die vier möglichen Basenkonstellationen sollen das Verfahren der Erfindung weiterhin erläutern:

Beispiel 2

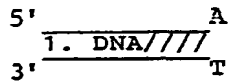


Oligonucleotide I: AATTCGAATT (Signalsequenz für Eco RI)
GATCCGGATC (Signalsequenz für Bam HI)
GTACCGGTAC (Signalsequenz für Kpn I)
TCGACGTCGA (Signalsequenz für Sal I)
AGCTCGAGCT (Signalsequenz für Sac I/Sst I)



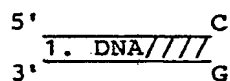
- 10 -

Beispiel 3



Oligonucleotide I: GATCTAGATC (Signalsequenz für Bgl II)
 TCGATATCGA (Signalsequenz für Cla I)
 AGCTTAAGCT (Signalsequenz für Hind III)
 AATTTAAATT (Signalsequenz für Aha III)

Beispiel 4



Oligonucleotide I: TGCAGCTGCA (Signalsequenz für Pst I)
 GATCGCGATC (Signalsequenz für Pvu I)
 TCGAGCTCGA (Signalsequenz für Xho I)

Beispiel 5



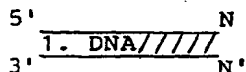
Oligonucleotide I: GATCATGATC (Signalsequenz für Bcl I)
 GTAGATCTAG (Signalsequenz für Xba I)

Für die Beispiele 1 - 5 ist die Kenntnis des endständigen Basenpaares der ersten DNA (Fremd-DNA) erforderlich. Demgegenüber genügt für einige Restriktionsendonucleasen das Vorhandensein der selbst komplementären Tetranucleotidsequenz, so daß diese Linker gemäß dem Verfahren der Er-

- 11 -

findung für jede Fremd-DNA verwendet werden können, gleichzeitig, welches endständige Basenpaar dort vorliegt, d.h. nach Ankopplung einiger der Oligonucleotide der Erfindung wird immer das kohäsive Ende der entsprechenden Restriktionsendonuclease erzeugt. Im folgenden werden hierfür einige Beispiele gegeben.

Beispiel 6



Oligonucleotide I: GATCCGGATC (Signalsequenz für MboI /Sau 3 A)
 TCGAGCTCGA (Signalsequenz für Taq I)
 AATTCGAATT (Signalsequenz für Eco RI*)
 AGCTCGAGCT (Signalsequenz für Alu I)

N ist eines der Nucleotide A, C, G und T; N' bedeutet das jeweils dazu komplementäre Nucleotid A, C, G und T.

Im folgenden wird ein Beispiel für den Einsatz eines Oligonucleotids gegeben, in dem R¹ eine Sequenz der Formel III und R² eine Sequenz der Formel IV mit den dort angegebenen Definitionen für A, C, G und T bzw. A*, C*, G* und T* sowie N und N' bedeuten, wobei die Sequenzen von R¹ und R², von links nach rechts gelesen, bis auf die zueinander komplementären Nucleotide N und N', identisch sind.

Beispiel 7



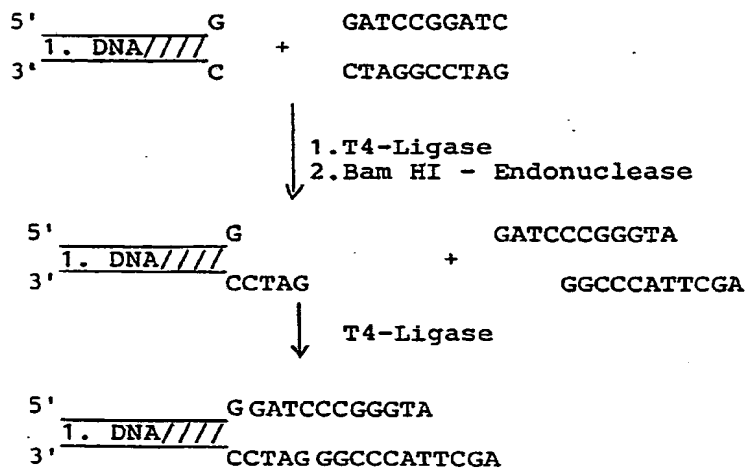
Oligonucleotide I: GTCACCGGTGAC (Signalsequenz für Bst EII)



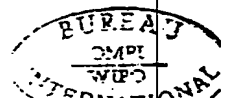
- 12 -

Falls aufgrund des gegebenen endständigen Basenpaares der Fremd-DNA nicht direkt die gewünschten kohäsiven Enden erzeugt werden können, gelingt dies in einem zwischen den Spaltungs- und Verknüpfungsschritt eingeschalteten zusätzlichen Verfahrensschritt. Im nachfolgenden Beispiel 8 besitzt die erste DNA (Fremd-DNA) ein endständiges GC-Basenpaar, so daß die für Hind III spezifischen kohäsiven Enden nicht direkt eingeführt werden können. Es wird daher zunächst der Bam HI-Linker und danach eine Bam HI-/Hind III-Adapter-DNA verwendet, um das gewünschte Ziel zu erreichen (Adapter-DNA kann als kurze DNA mit kohäsiven Enden unterschiedlicher Restriktionspezifität definiert werden):

Beispiel 8



Eine Verfahrensführung gemäß Beispiel 8 ermöglicht letztlich die Einführung jedes kohäsiven Endes unabhängig davon, welches endständige Basenpaar die erste DNA trägt, wobei entsprechend dem erfindungsgemäßen Konzept die erste DNA unverändert zurückerhalten werden kann.



- 13 -

Gemäß einer weiteren Variante des Verfahrens bzw. der Oligonucleotide der Erfindung können an definierten Positionen des Oligonucleotids Ribonucleotide eingebaut werden. Erfindungsgemäß können die Restriktionsendonuclease-spezifischen kohäsiven Enden auch ohne Verwendung der Restriktionsendonuclease eingeführt werden. Dies wird an den folgenden Beispielen 9 und 10 erläutert.

Beispiel 9

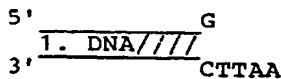
Kohäsives Ende für Eco RI:



↓ 1. T4-Ligase
2. OH⁻



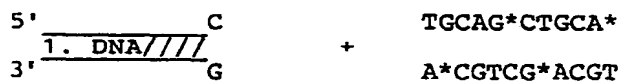
↓ 1. Phosphatase
2. JO₄⁻
3. Phosphatase



- 14 -

Beispiel 10

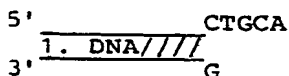
Kohäsives Ende für Pst I:



↓ 1. T4-Ligase
 ↓ 2. OH⁻



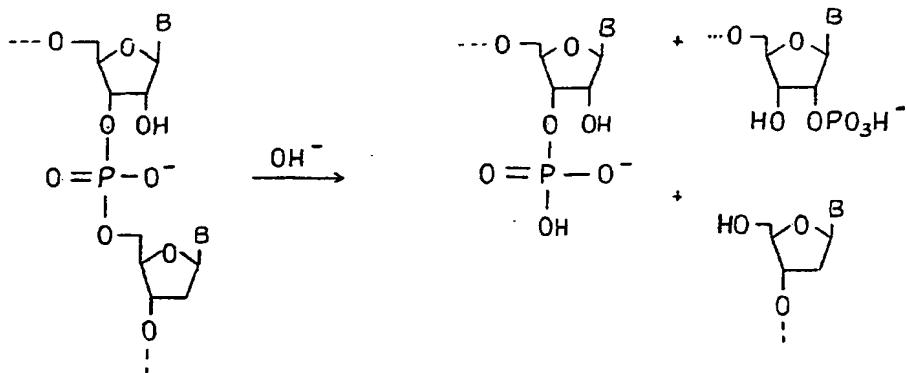
↓ 1. Phosphatase
 ↓ 2. JO₄⁻
 ↓ 3. Phosphatase



In den Beispielen 9 und 10 werden, ebenso wie in der folgenden Beschreibung, Ribonucleotide durch * gekennzeichnet.

Durch den Einbau eines Ribonucleotids wird innerhalb der DNA eine definierte alkalilabile Position geschaffen, wie sich aus dem folgenden Reaktionsschema ergibt:

- 15 -

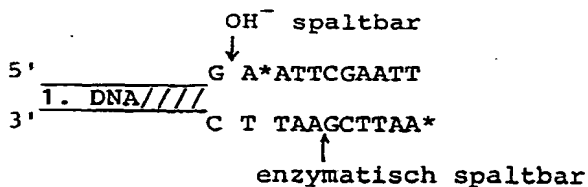


Dabei verbleibt der Phosphatrest der Internucleotidbindung am Ribonucleotid. Nach Behandlung mit Phosphatase wird eine 2', 3'-cis-Diolgruppierung geschaffen, die durch Perjodatbehandlung in bekannter Weise gespalten und ebenfalls in bekannter Weise unter milden alkalischen Bedingungen zur Eliminierung des Ribonucleotids führt. Zum Schluß wird durch erneute Phosphatasebehandlung das 3'-terminale Desoxyribonucleotid freigesetzt. Es kann vorteilhaft sein, diesen Schritt erst später in einer Reaktionssequenz durchzuführen, um dieses kohäsive Ende durch den 3'-Phosphatrest "geschützt" zu behalten.

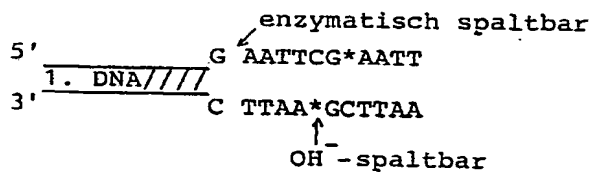
Ein weiterer Vorteil dieser Verfahrensvariante liegt darin, daß die Ribonucleotidpositionen so gewählt werden können, daß jeweils nur einer der beiden DNA-Stränge eine definierte alkalilabile Bruchstelle erhalten, bzw. der jeweils andere Strang durch die entsprechende Restriktionsendonuclease geschnitten werden kann. Dies wird im folgenden an zwei Beispielen erläutert:

- 16 -

Beispiel 11



Beispiel 12



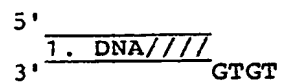
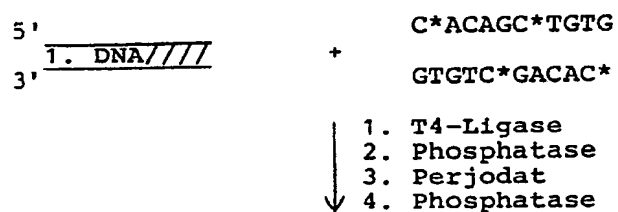
Das Verfahren der Erfindung ermöglicht auch die Einführung von kohäsiven Enden, die nicht selbst komplementär sind. In diesem Falle ist R¹ eine nicht in sich selbst komplementäre Tetra- oder Pentanucleotidsequenz oder eine in sich selbst oder nicht in sich selbst komplementäre Hexanucleotidsequenz der Formel V, VI bzw. VII gemäß dem Hauptanspruch (mit den dort angegebenen weiteren Definitionen); R² ist stets eine zu R¹ spiegelbildlich komplementäre Sequenz gleicher Länge mit 4, 5 oder 6 Nucleotiden. Wie weiter oben ausgeführt wurde, weist R¹ und/oder R² ein 5'-oder 3'-endständiges Ribonucleotid auf, wobei gegebenenfalls in dem Spacer (X)_n ein weiteres Ribonucleotid vorzusehen ist.

In Abhängigkeit davon, wo die Ribonucleotide positioniert sind, kann - bei gleicher Nucleotidsequenz - die Länge des kohäsiven Endes beeinflusst werden und das kohäsive Ende entweder an das 3'- oder 5'-Ende der ersten DNA (Fremd-DNA) dirigiert werden.

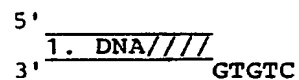
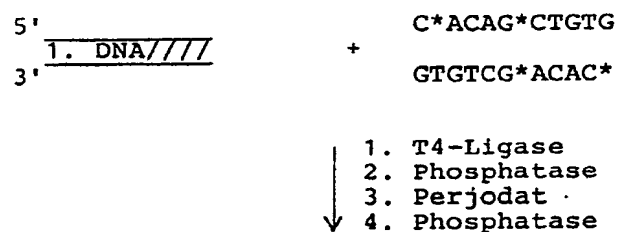
- 17 -

Die folgenden Beispiele erläutern diese Verfahrensvariante:

Beispiel 13

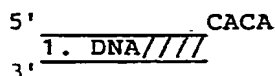
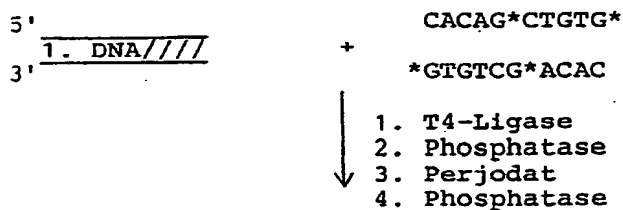


Beispiel 14

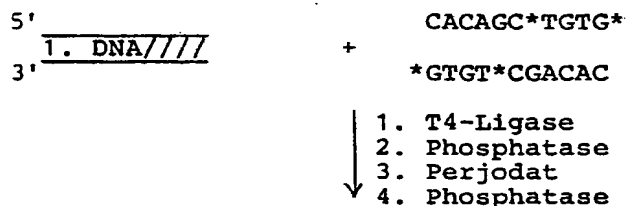


- 18 -

Beispiel 15



Beispiel 16

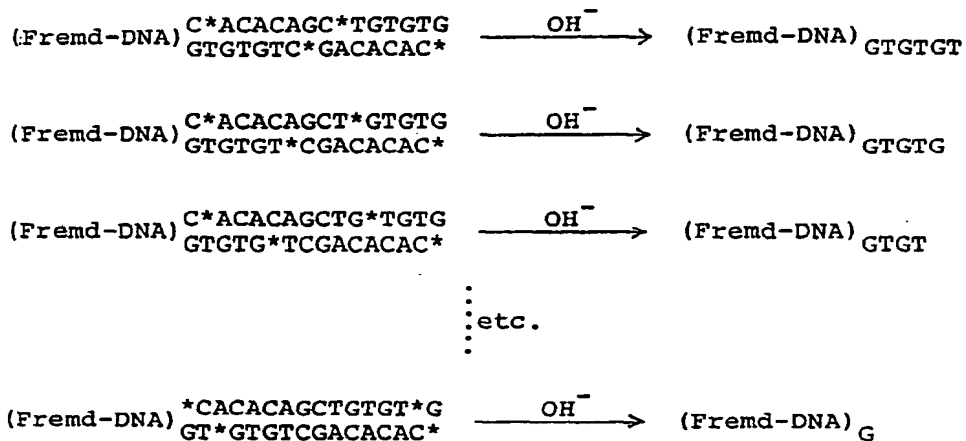


Durch geeignete Positionierung der Ribonucleotide ist auch bei dieser Verfahrensvariante möglich, die alkalilabile Bruchstelle in jeweils nur einem der beiden DNA-Stänge einzuführen. Dies ermöglicht z.B. bei ringförmiger, doppelsträngiger, entweder die Isolierung des Minus- oder des Plus-Stranges.

Das folgende Beispiel verdeutlicht, daß mit Oligonucleotiden I, in denen R^1 und R^2 in sich selbst oder nicht in sich selbst komplementäre Hexanucleotidsequenzen sind, kohäsive Enden erzeugt werden können, die, in Abhängigkeit von der Positionierung von Ribonucleotiden in den Resten R^1 , R^2 bzw. X, Kettenlängen von 1 - 6 Nucleotiden aufweisen.

- 19 -

Beispiel 17:



Die vorstehenden Beispiele offenbaren die große Flexibilität des Verfahrens der Erfindung, das immer dann von Vorteil ist, wenn DNA-Fragmente irreversibel miteinander verkoppelt werden

- 20 -

sollen oder wenn sich die Anwendung von Restriktionsendonucleasen verbietet, weil das Vorhandensein interner Signalsequenzen sehr wahrscheinlich ist. Dies ist bei hochmolekularen DNA-Fragmenten, z.B. zur Etablierung einer Genbank, fast immer der Fall.

Der in dem Oligonucleotid der Formel I enthaltene Spacer $(X)_n$ stellt kurze Oligonucleotidsequenzen dar, die als notwendiger Spacer unter Berücksichtigung der für die Restriktionsendonuclease-Erkennungsregion notwendigen Nucleotide und der erforderlichen Stabilität der durch Selbstkomplementarität sich bildenden doppelsträngigen DNA ausgewählt wird. Wird die zentrale Tetranucleotidsequenz nur durch die wenig Stabilität vermittelnden AT-Basenpaare gebildet, wie z.B. beim Eco RI-Linker

$$d(AATTCGAATT)$$

so kann die Stabilität z.B. durch Verlängerung des Spacers erhöht werden, z.B.

$$d(AATTCGCGAATT).$$

Dadurch kann eine weitere Erkennungsregion für eine Restriktionsendonuclease eingeführt werden, z.B. für $X = CCCGGG$ hat der Eco RI-Linker die Formel

$$\begin{array}{c} \text{XmaI} \quad \text{SmaI} \\ | \quad | \\ d(AATTC \quad CCCGGAATT) \\ | \quad | \end{array}$$

Hier wird nicht nur mit dem Linker die Eco RI-Signalsequenz in eine Fremd-DNA eingeführt, die GC als endständiges Basenpaar besitzt, sondern auch noch die recht seltene Erkennungssequenz



- 21 -

für SmaI/XmaI .

Das folgende Ausführungsbeispiel betrifft die Herstellung und erfindungsgemäße Anwendung eines Oligonucleotids der Erfindung der Formel d(GATCCGGATC).

Beispiel 18

Herstellung von d(GATCCGGATC) (vgl. Tetrahedron Let. 1983, 747)

100 mg C-Träger (10 μMol N-benzoyliertes C, kovalent gebunden an "Controlled Pore Glass" (CPG), werden nacheinander mit je 100 μMol der durch MSNT (1,5 Äquivalente/ PO^-) aktivierten N-geschützten, 5'-dimethoxytritylierten Desoxynucleosid-3'-(2-chlorphenyl)-phosphodiester T, A, G, G, C, C, T, A und G umgesetzt. Ein Reaktionszyklus umfaßt Kondensation (45') in Pyridin, Waschen mit Pyridin, Capping mit Essigsäureanhydrid/Pyridin (10'), Waschen mit Pyridin, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (7:3) und Abspalten der Dimethoxytritylgruppe mit gesättigtem ZnBr_2 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ (7:3) für 10' und Waschen mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (7:3) sowie Pyridin.

Die durchschnittlichen Kondensationsausbeuten liegen bei 90 - 95 %.

Nach der letzten Kondensation erfolgt Abspaltung der 2-Chlor-Phenylgruppe durch Behandeln mit Oximateagenz (vgl. Tetrahedron Let. 1978, 2727),

3 ml, für 24 h, Abspaltung vom Träger und Entfernung der N-Arylgruppen durch Behandlung mit konzentriertem wässrigem Ammoniak, 12 h bei 50° C. Nach dem Einengen und 5-facher Extraktion mit je 5 ml CHCl_3 wird die wässrige Lösung durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose in der üblichen Weise gereinigt (vgl. Liebig's Ann. 1978, 839 und



- 22 -

Tetrahedron Let. 1983, 747).

Das gereinigte Material wird in üblicher Weise durch Polyacrylamidgelelektrophorese (20 %, 7M Harnstoff) und Vergleich mit einem Homo-oligo-dT-Kettenlängenstandard und durch Sequenzierung entweder nach Maxam-Gilbert oder nach der "mobility shift"-Methode charakterisiert.

Ligation:

Um das Ligationssubstrat zu erhalten, wird pBR 322 mit Bal I (TGG↓CCA) in üblicher Weise linearisiert und auf diese Weise die DNS mit dem stumpfen ^GC-Ende versehen. Die Ligation erfolgt in 66 mM Tris-HCl (pH 7,6), 6,6 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0,4 mM ATP und 4 Einheiten T4-Ligase pro 20 µl Reaktionsvolumen. Der Linker wird im 50-fachen Überschuß über die Termini verwendet. Die Ligationsdauer beträgt 24 h bei 10° C.

Anschließend wird mit Bam HI in der üblichen Weise inkubiert; die entstandenen Bam HI-kohäsiven Enden werden in gleicher Weise wie oben angegeben, jedoch mit lediglich 0,02 Einheiten T4-Ligase, pro 20 µl ligiert. Die Reaktionsdauer beträgt 1 h bei 22° C.

Die Agarosegelelektrophorese zeigt Umwandlung der linearen pBR 322-DNS in circuläre DNS unter Ligationsbedingungen, unter denen nur kohäsive, nicht jedoch stumpfe Enden ligiert werden.



Tabelle I

TTTT	AAAT	CCCT	GGGT	TCAT	TCGT	TACT
TTTA	AAAA	CCCA	GGGA	TCAA		TACA
TTTC	AAAC	CCCC	GGGC	TCAC	TCGT	TACC
TTTG	AAAG	CCCG	GGGG	TCAG	TCGG	TACG
TTCT		CCTT	GGTT	TGCT	TGAT	TAGT
TTCA	AATA	CCTA	GGTA		TGAA	TAGA
TTCC	AATC	CCTC	GGTC	TGCC	TGAC	TAGC
TTCG	AATG	CCTG	GGTG	TGCG	TGAG	TAGG
TTAT	AACT	CCAT	GGAT	CTAT	CTGT	GATT
	AACA	CCAA	GGAA	CTAA	CTGA	GATA
TTAC	AACC	CCAC	GGAC	CTAC	CTGC	
TTAG	AACG	CCAG	GGAG		CTGG	GATG
TTGT	AAGT	CCGT	GGCT	CATT	CAGT	GACT
TTGA	AAGA	CCGA	GGCA	CATA	CAGA	GACA
TTGC	AAGC	CCGC		CATC	CAGC	GACC
TTGG	AAGG		GGCG		CAGG	GACG
TATT		CTCT	GTGT	CGTT	CGAT	
	ATAA	CTCA	GTGA	CGTA	CGAA	
TATC	ATAC	CTCC	GTGC	CGTC	CGAC	
TATG	ATAG	CTCG	GTGG	CGTG	CGAG	
TCTT	ACAT	CACT	GAGT	ATCT	ATGT	
TCTA	ACAA	CACA	GAGA	ATCA	ATGA	
TCTC	ACAC	CACC	GAGC	ATCC	ATGC	
TCTG	ACAG	CACG	GAGG	ATCG	ATGG	
TGTT	AGAT	CGCT	GCGT	ACTT		
TGTA	AGAA	CGCA	GCGA	ACTA	ACGA	
TGTC	AGAC	CGCC		ACTC	ACGC	
TGTG	AGAG		GCGG	ACTG	ACGG	
TAAT	ATTT	CTTT	GTTT	AGTT		
TAAA	ATTA	CTTA	GTTA	AGTA	AGCA	
TAAAC	ATTTC	CTTTC	GTTTC	AGTTC	AGCC	
TAAAG	ATTG	CTTG	GTTG	AGTG	AGCG	
TCCT	ACCT	CAAT	GAAT	GTCT	GTAT	
TCCA	ACCA	CAAA	GAAA	GTCA	GTAA	
TCCC	ACCC	CAAC	GAAC	GTCC		
TCCG	ACCG	CAAG	GAAG	GTCG	GTAG	
TGGT	AGGT	CGGT	GCCT	GCTT	GCAT	
TGGA	AGGA	CGGA	GCCA	GCTA	GCAA	
TGGC	AGGC	CGGC	GCCC	GCTC	GCAC	
TGGG	AGGG	CGGG	GCCG	GCTG	GCAG	

- 24 -

Patentansprüche

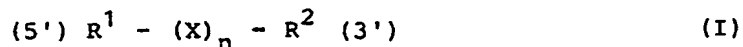
1. Verfahren zur definierten Verknüpfung doppelhelikaler DNA-Fragmente über kohäsive Enden mit den Schritten:
 1. Umsetzung eines ersten DNA-Fragmentes an dessen stumpfen Ende mit einer kurzen, beidseitig stumpfen doppelhelikalen Linker-DNA in Gegenwart von Ligasen,
 2. Spaltung der so erhaltenen DNA im Bereich der Linkersequenz unter Ausbildung des eine Sequenz von 1 - 6 Nucleotide aufweisenden kohäsiven Endes und
 3. Verknüpfung der so erhaltenen, das kohäsive Ende aufweisenden DNA mit einem ein kohäsives Ende aufweisenden zweiten DNA-Fragment in Gegenwart von Ligasen,

wobei die kohäsiven Enden der ersten und zweiten DNA-Fragmente zueinander komplementär sind, dadurch gekennzeichnet, daß man als Linker-DNA ein in sich selbst

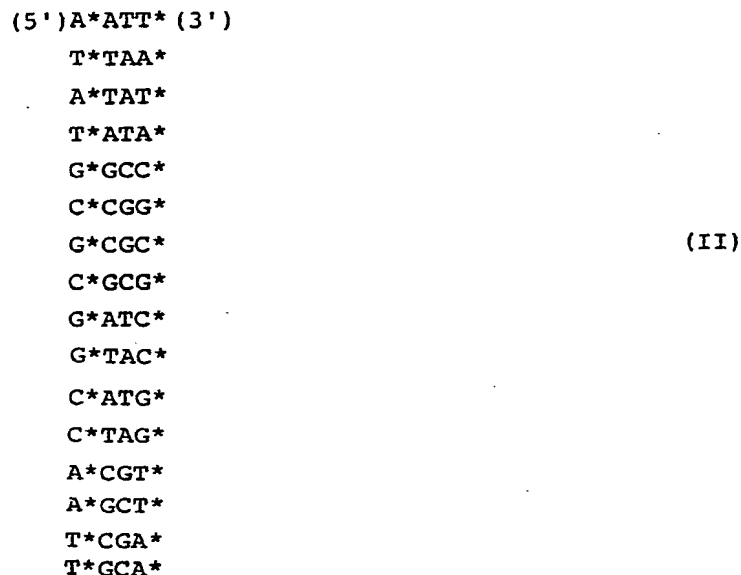


- 25 -

komplementäres, unter Ligationsbedingungen als Doppelhelix vorliegendes Oligonucleotid der allgemeinen Formel I



in der R^1 und R^2 von links nach rechts gelesen identische, in sich selbst komplementäre Tetradeseoxy- oder Monoribotrideseoxy-nucleotidsequenzen aus der Gruppe der Sequenzen der Formel II



in denen A, C, G und T bzw. A*, C*, G* und T* Adenin-, Cytosin-, Guanin- bzw. Thymidinnucleotide sind, wobei A*, C*, G* und T* entweder das 5'- bzw. 3'-endständige Desoxy- oder das 5'- bzw. 3'-endständige Ribonucleotid bedeuten und das Ribothymidinnucleotid T* durch das Ribouridinnucleotid ersetzt sein kann,



- 26 -

oder

R¹ eine Pentadesoxy- oder Monoribotetradesoxy-nucleotid-sequenz aus der Gruppe der Sequenzen der Formel III

(5')A*ANTT*(3')

T*TNAA*

A*TNAT*

T*ANTA*

G*GNCC*

C*CNCG*

G*CNCG*

C*GNCG*

G*ANTC*

(III)

G*TNAC*

C*ANTG*

C*TNAG*

A*CNCT*

A*GNCT*

T*CNCA*

T*GNCA*

bedeutet, wobei A, C, G und T bzw. A*, C*, G* und T* wie oben definiert sind und N eines der Nucleotide A, T, C oder G bedeutet,

und R² eine Pentadesoxy- oder Monoribotetradesoxy-nucleotid-sequenz aus der Gruppe der Sequenzen der Formel IV



- 27 -

(5') A*AN'TT* (3')

T*TN'AA*

A*TN'AT*

T*AN'TA*

G*GN'CC*

C*CN'GG*

G*CN'GC*

C*GN'CG*

G*AN'TC*

G*TN'AC*

C*AN'TG*

C*TN'AG*

A*CN'GT*

A*GN'CT*

T*CN'GA*

T*GN'CA*

(IV)

bedeuten, wobei A, C, G und T bzw. A*, C*, G* und T* wie oben definiert sind, N' das zu N komplementäre Nucleotid A, T, C oder G ist und die Sequenzen der Gruppen R¹ und R² bis auf die zueinander komplementären Nucleotide N und N', von links nach rechts gelesen, identisch sind,

oder

R¹ eine der durch Kombination der vier Nucleotide A, C, G und T möglichen, nicht in sich selbst komplementären Tetra- oder Pentanucleotidsequenzen der Formeln V oder VI oder eine in sich selbst komplementäre oder nicht in sich selbst komplementäre Hexanucleotidsequenz der Formel VII



- 28 -

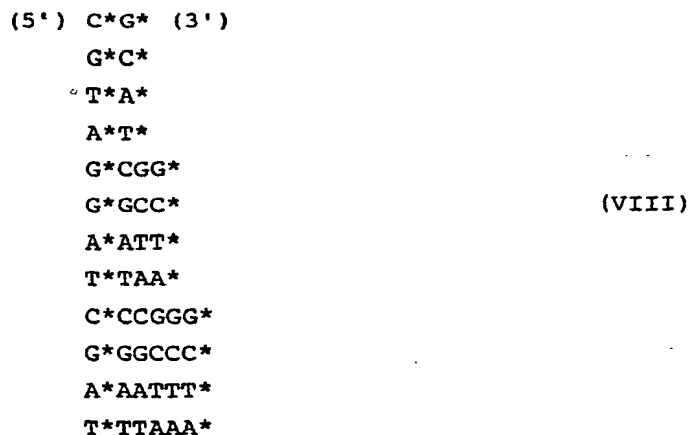
$(5')N^1-N^2-N^3-N^4(3')$	(V)
$(5')N^1-N^2-N^3-N^4-N^5(3')$	(VI)
$(5')N^1-N^2-N^3-N^4-N^5-N^6(3')$	(VII)

bedeuten,

wobei N^1 , N^2 , N^3 , N^4 , N^5 und N^6 eines der Nucleotide A, T, C oder G ist, und R^2 eine zu R^1 spiegelbildlich komplementäre Tetra-, Penta- bzw. Hexanucleotidsequenz der Formeln V, VI bzw. VII mit den oben angegebenen Bedeutungen für N^1 , N^2 , N^3 , N^4 , N^5 und N^6 ist und entweder R^1 eine Monoribotridesoxy-, Monoribotetradesoxy- oder Monoribopentadesoxynucleotidsequenz und R^2 eine Tetradesoxy-, Pentadesoxy- oder Hexadesoxynucleotidsequenz oder R^1 eine Tetradesoxy-, Pentadesoxy- oder Hexadesoxynucleotidsequenz und R^2 eine Monoribotridesoxy-, Monoribotetradesoxy- oder Monoribopentadesoxynucleotidsequenz ist, oder R^1 eine zu R^2 spiegelbildlich komplementäre Monoribotridesoxy-, Monoribotetradesoxy- oder Monoribopentadesoxysequenz ist, wobei sich das Ribonucleotid am 5'- oder 3'-Ende von R^1 oder am 5' oder 3'-Ende von R^2 befindet, und wobei 5'- bzw. 3'- ständiges Ribothymidin durch Ribouridin ersetzt sein kann,

- 29 -

X ein Oligonucleotid aus der Gruppe der Sequenzen der Formel VIII



in denen A, C, G und T bzw. A*, C*, G* und T* wie oben definiert sind, und

n eine ganze Zahl von 1 - 5 bedeutet,

verwendet,

und die Spaltung der so erhaltenen doppelhelikalen DNA im Linkerbereich bei Nucleotidsequenzen, die keine Ribonucleotide enthalten, in an sich bekannter Weise mit einer für das zu erzeugende kohäsive Ende spezifischen Restriktionsendonuclease der Klassen II oder III und bei Ribonucleotide enthaltenden Nucleotidsequenzen mit Basen oder Ribonucleasen vornimmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das ein kohäsives Ende aufweisende erste DNA-Fragment vor der Verknüpfung mit dem zweiten DNA-Fragment mit einer an sich bekannten, kohäsive Enden unterschiedlicher Restriktionsspezifität aufweisenden Adapter-DNA umsetzt.



- 30 -

3. Unter Ligationsbedingungen doppelhelikale Linker-DNA der Formel I



in der R^1 , R^2 , X und n wie oben definiert sind.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP84/00196

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁴ : C12N 15/00, C07H 21/04		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁴	C12N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category *	Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
X	EP, A, 0046669 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 3 March 1982, see claims 1-11; page 25 to page 27; page 36 lines 5-10 ----	3
X	US, A, 4321365 (R.J.WU), 23 March 1982, see claims 1-11; columns 7,8, lines 38-56 ----	3
X	EP, A, 0036258 (CETUS CORP.), 23 September 1981, see claims 1-19; page 11, lines 19-26 ----	3
X	GB, A, 2073245 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY), 14 October 1981, see claims 1-6; page 2, lines 60-63 -----	3
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁹</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search *	Date of Mailing of this International Search Report *	
4 October 1984 (04.10.84)	6 November 1984 (06.11.84)	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ²⁰	
European Patent Office		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/EP 84/00196 (SA 7413)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 19/10/84

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0046669	03/03/82	AU-A- 7447881	04/03/82
		JP-A- 57126455	06/08/82
US-A- 4321365	23/03/82	CA-A- 1171371	24/07/84
EP-A- 0036258	23/09/81	JP-A- 56140897	04/11/81
		AU-A- 6800481	17/09/81
GB-A- 2073245	14/10/81	FR-A,B 2478670	25/09/81
		DE-A- 3111592	11/03/82
		AU-A- 6861981	23/09/82

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 84/00196

I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGS-GEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int. Kl. ⁴ C 12 N 15/00; C 07 H 21/04		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ¹		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Kl. ⁴	C 12 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ²		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ³		
Art ⁴	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der Maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr. ⁵
X	EP, A, 0046669 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 3. März 1982 siehe Patentansprüche 1-11; Seite 25 bis Seite 27; Seite 36, Zeilen 5-10 --	3
X	US, A, 4321365 (R.J. WU) 23. März 1982 siehe Patentansprüche 1-11; Spalten 7,8, Zeilen 38-56 --	3
X	EP, A, 0036258 (CETUS CORP.) 23. September 1981 siehe Patentansprüche 1-19; Seite 11, Zeilen 19-26 --	3
X	GB, A, 2073245 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY) 14. Oktober 1981	./.
<p>¹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>A⁶ Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>E⁷ älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>L⁸ Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>O⁹ Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>P¹⁰ Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>T¹¹ Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>X¹² Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>Y¹³ Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>Z¹⁴ Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche ¹⁵		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts ¹⁶
4. Oktober 1984		06 NOV. 1984
Internationale Recherchenbehörde ¹⁷		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten ¹⁸
EUROPÄISCHES PATENTAMT		G. L. M. Kreydenberg

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (FORTSETZUNG VON BLATT 2)		
Art	Bezeichnung der Veröffentlichung * soweit erforderlich unter Angabe der maßgebenden Teile	Beitrag Anspruch Nr.
	<p>siehe Patentansprüche 1-6; Seite 2, Zeilen 60-63</p> <p>-----</p>	3

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE

INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. PCT/EP 84/00196 (SA 7413)

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 19/10/84

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0046669	03/03/82	AU-A- 7447881 JP-A- 57126455	04/03/82 06/08/82
US-A- 4321365	23/03/82	CA-A- 1171371	24/07/84
EP-A- 0036258	23/09/81	JP-A- 56140897 AU-A- 6800481	04/11/81 17/09/81
GB-A- 2073245	14/10/81	FR-A, B 2478670 DE-A- 3111592 AU-A- 6861981	25/09/81 11/03/82 23/09/82

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang :
siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82

THE STAMP OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE
AFFIXED HERETO WILL BE EVIDENCE OF RECEIPT OF THE
FOLLOWING (SENT VIA FIRST CLASS PRIORITY MAIL) ON
January 13, 2003

Client No.: 24824-6089

Enclosures: 1) Recordation Form Cover Sheet; 2) Copy of
three executed Assignments from inventors; 3) Check in the
amount of \$40; 4) Transmittal Letter (in duplicate); 5) This
return postcard

Applicant(s): Barton et al.

Serial No. 10/223,232 Filed: August 15, 2002

For: REMOTE MODULE FOR A COMMUNICATIONS
NETWORK

SLS:kcc

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.